

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

#6
J1017 U.S. PRO
09/829467
04/09/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2000年 4月10日

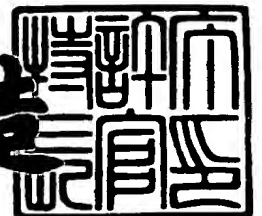
出 願 番 号
Application Number: 特願2000-107675

出 願 人
Applicant (s): 富士写真フイルム株式会社

2001年 3月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3023066

【書類名】 特許願

【整理番号】 A01180MA

【提出日】 平成12年 4月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社 朝霞研究所内

【氏名】 篠木 浩

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社 朝霞研究所内

【氏名】 猪股 弘子

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社 朝霞研究所内

【氏名】 小島 政芳

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社 朝霞研究所内

【氏名】 須藤 幸夫

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水3丁目11番46号 富士写真フイルム株式会社 朝霞研究所内

【氏名】 瀬志本 修

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【連絡先】 0 3 - 3 2 7 1 - 1 3 3 1

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9800464

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光ヌクレオチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式： $A-B-C$

で表される蛍光ヌクレオチド。

[式中、Aは天然又は合成のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基を示し、上記残基中の塩基部分でBと結合し、Bは2価の連結基または単結合を示し、Cは、分子内に0ないし1個のスルホン酸基またはリン酸基を有する蛍光色素から誘導される1価の基を示す。]

【請求項2】 式： $A-B-C$

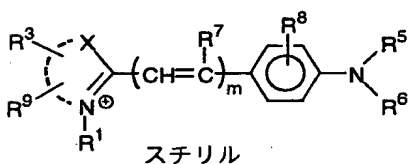
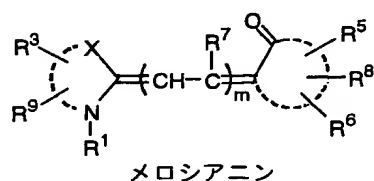
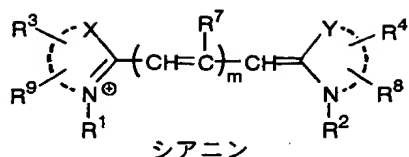
で表される蛍光ヌクレオチド。

[式中、Aは天然又は合成のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基を示し、上記残基中の塩基部分でBと結合し、Bは2価の連結基または単結合を示し、Cは分子内にスルホン酸基、リン酸基、カルボン酸基以外の水溶性基を有する蛍光色素から誘導される1価の基を示す。]

【請求項3】 蛍光色素がシアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素である、請求項1又は2に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項4】 シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素が以下の一般式で表される構造を有する蛍光色素である、請求項3に記載の蛍光ヌクレオチド。

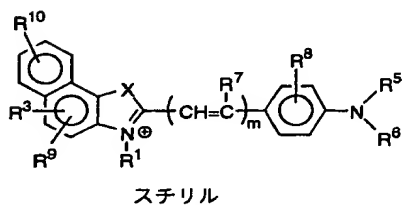
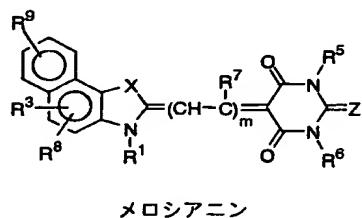
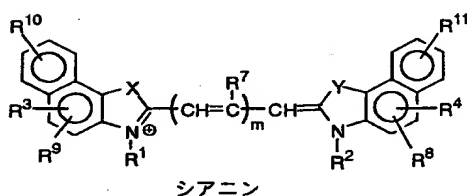
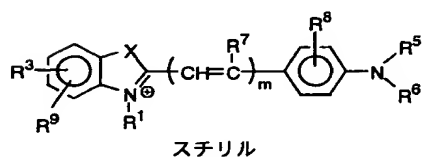
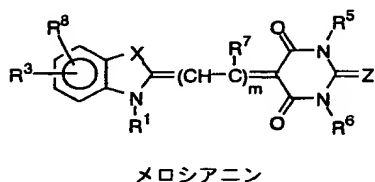
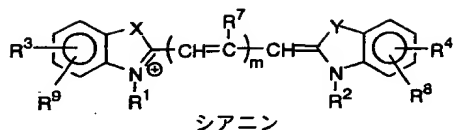
【化 1】



〔式中、XおよびYはそれぞれ独立にO、SおよびC(CH₃)₂よりなる群から選ばれ、mは1、2、3および4よりなる群から選ばれる整数であり、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、又はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示し、該アルキル基のアルキル鎖中には酸素原子又は硫黄原子が介在していてもよく、R¹及びR²の少なくとも片方はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示す。R³からR⁹はそれぞれ独立して水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。点線はそれぞれ前記シアニン、メロシアニンおよびスチリル蛍光色素を形成するのに必要な炭素原子を表す。〕

【請求項5】 シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素が以下の一般式で表される構造を有する蛍光色素である、請求項3又は4に記載の蛍光ヌクレオチド。

【化 2】



[式中、XおよびYはそれぞれ独立にO、SおよびC(CH₃)₂よりなる群から選ばれ、ZはOおよびSよりなる群から選ばれ、mは1、2、3および4よりなる群から選ばれる整数であり、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、又はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示し、該アルキル基のアルキル鎖中には酸素原子又は硫黄原子が介在していてもよく、R¹及びR²の少なくとも片方はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキ

ル基を示す。R³からR¹¹はそれぞれ独立して、水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。]

【請求項6】 R¹及びR²の少なくとも1つが、基B中のアミノ基、ヒドロキシル基、又はチオール基と共有結合し得る活性エステル基で置換されたアルキル基である、請求項4又は5に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項7】 R¹及びR²の少なくとも1つが、カルボキシル基で置換されたアルキル基である請求項4または5に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項8】 Aがヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基である、請求項1から7の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項9】 Aが(1) AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、CMP、CDP、CTP、UMP、UDP、UTP、TMP、TDP、TTP、2-Me-AMP、2-Me-ADP、2-Me-ATP、1-Me-GMP、1-Me-GDP、1-Me-GTP、5-Me-CMP、5-Me-CDP、5-Me-CTP、5-MeO-CMP、5-MeO-CDP、5-MeO-CTPから成るヌクレオチドから成る群、(2) 前記ヌクレオチドに対応するデオキシヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチドから成る群、並びに(3) 前記(1)および(2)に記載のヌクレオチドからさらに誘導される誘導体、から成る群から選ばれる天然又は合成のヌクレオチド又はその誘導体の残基を示す、請求項1から8の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項10】 Bが-CH₂-、-CH=CH-、-C≡C-、-CO-、-O-、-S-、-NH-またはこれらの組み合わせから成る連結基であって、連結基上の水素原子は置換基でさらに置換されていてもよい連結基である、請求項1から9の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項11】 Bがアミノアリル基である、請求項1から10の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチド。

【請求項12】 核酸合成酵素と鋳型核酸と請求項1から11の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチドとを用いて核酸合成反応を行うことを含む、蛍光標識された核酸の調製方法。

【請求項13】 核酸合成反応が、逆転写反応、ターミナルトランスフェラ

ーゼ反応、ランダムプライム法、PCR法またはニクトランスレーション法から成る群から選ばれる反応である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 請求項1から11の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチドで標識された核酸プローブまたはプライマー。

【請求項15】 請求項1から11の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチドから成る核酸検出用試薬または診断薬。

【請求項16】 (1) 請求項1から11の何れか1項に記載の蛍光ヌクレオチド、(2) 核酸合成酵素および(3) 緩衝液を含む、核酸検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛍光ヌクレオチド並びにその利用に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

相同核酸配列の検出のために最も多く用いられる分子生物学的方法の1つはDNA/DNA、RNA/RNA又はRNA/DNAハイブリッド形成である。この方法ではプローブとして用いる核酸(DNA又はRNA)を標識し、この標識された核酸を検出すべき核酸(DNA又はRNA)とハイブリダイゼーションさせる。プローブとして用いた核酸と検出すべき核酸の間に相同性が存在する場合、それぞれの相補的な1本鎖の核酸がハイブリダイゼーションし、2本鎖が形成され、その2本鎖をプローブの標識により検出する。

【0003】

従来より核酸をプローブとして用いる場合、ラジオアイソトープでプローブを標識する方法が用いられ、プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションの有無はオートラジオグラフィーにより検出されていた。

遺伝子プローブを標識する際にラジオアイソトープを利用する方法は特に感度が高い点で優れているが、ラジオアイソトープの取り扱いに付随して実験室の安全性の確保及び放射性化合物の廃棄の問題という繁雑さが存在していた。また、ラジオアイソトープは半減期を有するため、一定期間しか用いることができない

という問題点もあった。

【0004】

上記理由から、より簡便な方法として非放射性標識法が開発されてきており、例えば、遺伝子プローブをビオチン分子（欧州特許第0 0 6 3 8 7 9号明細書）又はジゴキシゲニン分子（欧州特許第0 3 2 4 4 7 4 A 1号明細書）を用いて標識する方法が知られている。標識核酸プローブと検出すべき核酸配列とのハイブリダイゼーションを行った後、形成された2本鎖核酸の中にはビオチン分子またはジゴキシゲニン分子が存在する。ハイブリダイゼーション後、これらに対して（ストレプト）アビジン-マーカ-酵素複合体又はジゴキシゲニンへの抗-ジゴキシゲニン抗体-マーカ-酵素複合体を結合することによって、プローブがハイブリダイゼーションした核酸を検出することができる。しかしながら、このような酵素を用いた検出法は、感度や特異性の面で十分なものではなかった。

【0005】

また上記方法以外にも、蛍光色素で標的物質を標識する方法が種々研究されている。蛍光標識試薬に求められる性能としては、（1）高い蛍光量子収率を有すること、（2）高い分子吸光係数を有すること、（3）水溶性で、かつ水性溶媒中で凝集して自己消光を起こさないこと、（4）加水分解を受けにくいこと、（5）光分解が起こりにくいこと、（6）バックグラウンド蛍光の影響を受けにくいこと、（7）標的物質と共有結合を生じさせる反応性置換基が導入されていることなどが挙げられる。

蛍光標識試薬として古くから知られているフルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネートは高い蛍光量子収率を有するものの、分子吸光係数が低く、また励起及び発光波長が500nm-600nmであるため、例えばブロッティングに用いるメンブレンのバックグラウンド蛍光の影響を受けやすいという欠点がある。

【0006】

分子吸光係数の高い色素としては、例えば米国特許第5486616号明細書、特開平2-191674号公報、同5-287209号公報、同5-287266号公報、同8-47400号公報、同9-127115号公報、同7-14

5148号公報、同6-222059号公報に記載されたシアニン色素、Journal of Fluorescence, 5, 231ページ(1995年)に記載されたバルビツール酸オキソノール等のポリメチン色素が知られているが、これらは水に溶けにくく、また溶解しても加水分解が生じる等の問題がある。また、色素同士の分子間相互作用が強いために水性媒体中で凝集体を生じ、そのため蛍光の自己消光が観測される場合が多い。

また、特開平2-191674号公報等に記載されているシアニン色素は比較的安定な発色団にスルホン酸基を導入することで水溶性を付与し、かつ凝集体の形成を抑制した優れた色素であるが、核酸合成反応、例えば、逆転写反応による蛍光ヌクレオチドの取り込み効率が悪い等の問題点があった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、核酸の効率的な標識のために有用な蛍光ヌクレオチドを提供することを解決すべき課題とした。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、マイナスチャージの低い蛍光標識試薬を用いたヌクレオチドとの複合体を形成し、その複合体を用いて核酸を標識および検出した結果、核酸への取り込み率が大幅に向上したことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明によれば、式： $A-B-C$ で表される蛍光ヌクレオチドが提供される。

[式中、Aは天然又は合成のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基を示し、上記残基中の塩基部分でBと結合し、Bは2価の連結基または単結合を示し、Cは、分子内に0ないし1個のスルホン酸基またはリン酸基を有する蛍光色素から誘導される1価の基を示す。]

【0010】

本発明によればさらに、式：A-B-C

で表される蛍光ヌクレオチドが提供される。

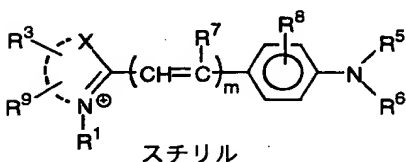
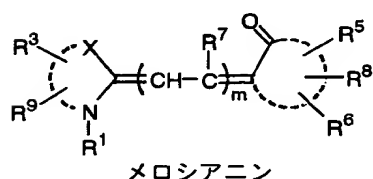
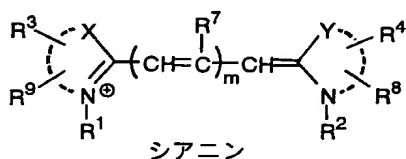
[式中、Aは天然又は合成のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基を示し、上記残基中の塩基部分でBと結合し、Bは2価の連結基または単結合を示し、Cは分子内にスルホン酸基、リン酸基、カルボン酸基以外の水溶性基を有する蛍光色素から誘導される1価の基を示す。]

好ましくは、蛍光色素はシアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素である。

【0011】

好ましくは、シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素は以下の一般式で表される構造を有する蛍光色素である。

【化3】



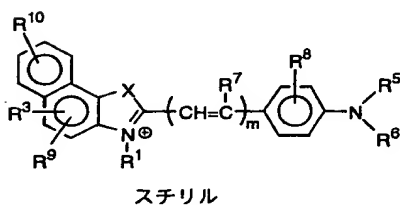
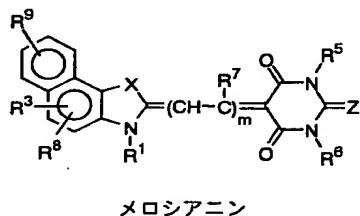
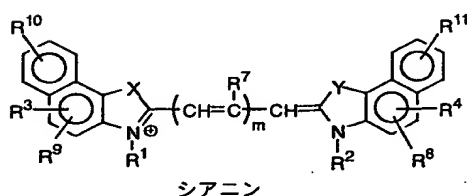
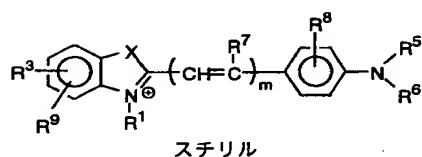
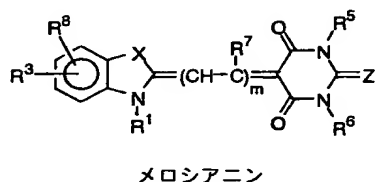
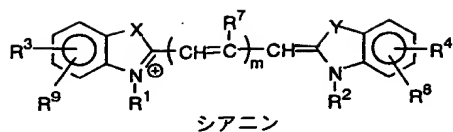
[式中、XおよびYはそれぞれ独立にO、SおよびC(CH₃)₂よりなる群から選ばれ、mは1、2、3および4よりなる群から選ばれる整数であり、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、又はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示し、該アルキル基のアルキル鎖中には酸素原子又は硫

黄原子が介在していてもよく、 R^1 及び R^2 の少なくとも片方はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示す。 R^3 から R^9 はそれぞれ独立して水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。点線はそれぞれ前記シアニン、メロシアニンおよびスチリル蛍光色素を形成するのに必要な炭素原子を表す。]

【0012】

より好ましくは、シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素は以下の一般式で表される構造を有する蛍光色素である。

【化 4】



[式中、XおよびYはそれぞれ独立にO、SおよびC(CH₃)₂よりなる群から選ばれ、ZはOおよびSよりなる群から選ばれ、mは1、2、3および4よりなる群から選ばれる整数であり、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、又はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示し、該アルキル基のアルキル鎖中には酸素原子又は硫黄原子が介在していてもよく、R¹及びR²の少なくとも片方はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキ

ル基を示す。 R^3 から R^{11} はそれぞれ独立して、水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。]

【0013】

好ましくは、 R^1 及び R^2 の少なくとも1つは、基B中のアミノ基、ヒドロキシル基、又はチオール基と共有結合し得る活性エステル基で置換されたアルキル基である。

好ましくは、 R^1 及び R^2 の少なくとも1つは、カルボキシル基で置換されたアルキル基である。

【0014】

好ましくは、Aはヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基である。

より好ましくは、Aは(1) AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、CMP、CDP、CTP、UMP、UDP、UTP、TMP、TDP、TTP、2-Me-AMP、2-Me-ADP、2-Me-ATP、1-Me-GMP、1-Me-GDP、1-Me-GTP、5-Me-CMP、5-Me-CDP、5-Me-CTP、5-MeO-CMP、5-MeO-CDP、5-MeO-CTPから成るヌクレオチドから成る群、(2) 前記ヌクレオチドに対応するデオキシヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチドから成る群、並びに(3) 前記(1)および(2)に記載のヌクレオチドからさらに誘導される誘導体、から成る群から選ばれる天然又は合成のヌクレオチド又はその誘導体の残基を示す。

【0015】

好ましくは、Bは $-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-CO-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ またはこれらの組み合わせから成る連結基であって、連結基上の水素原子は置換基でさらに置換されていてもよい連結基である。

より好ましくは、Bはアミノアシル基である。

【0016】

本発明の別の側面によれば、核酸合成酵素と鋳型核酸と本発明の蛍光ヌクレオチドとを用いて核酸合成反応を行うことを含む、蛍光標識された核酸の調製方法が提供される。

好ましくは、核酸合成反応は、逆転写反応、ターミナルトランスフェラーゼ反応、ランダムプライム法、PCR法またはニックトランスレーション法から成る群から選ばれる反応である。

【0017】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛍光ヌクレオチドで標識された核酸プローブまたはプライマーが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛍光ヌクレオチドから成る核酸検出用試薬または診断薬が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、(1) 本発明の蛍光ヌクレオチド、(2) 核酸合成酵素および(3) 緩衝液を含む、核酸検出用キットが提供される。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。本発明は式：A-B-Cで表される蛍光ヌクレオチドに関する。

上記式中、Aは天然又は合成のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基を示す。天然又は合成のヌクレオチドとしては、(1) AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、CMP、CDP、CTP、UMP、UDP、UTP、TMP、TDP、TTP、2-Me-AMP、2-Me-ADP、2-Me-ATP、1-Me-GMP、1-Me-GDP、1-Me-GTP、5-Me-CMP、5-Me-CDP、5-Me-CTP、5-MeO-CMP、5-MeO-CDP、5-MeO-CTPから成るヌクレオチドから成る群、(2) 前記ヌクレオチドに対応するデオキシヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチドから成る群、並びに(3) 前記(1)および(2)に記載のヌクレオチドからさらに誘導される誘導体、から成る群から選ばれる天然又は合成のヌクレオチド又はその誘導体が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。天然又は合成のヌクレオチドのより具体的な例としては、ATP、CTP、GTP、TTP、UTP、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP、ddUTP、又はこれらの誘導体などを挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

【 0 0 1 9 】

オリゴヌクレオチドとは、上記ヌクレオチドまたはその誘導体が 1 ～ 5 0 個程度、好ましくは 1 ～ 3 0 個程度、さらに好ましくは 1 ～ 2 0 個程度重合して成るものであり、構成単位の各ヌクレオチドは同一でも相違していてもよい。ポリヌクレオチドとは、上記ヌクレオチドまたはその誘導体が多数重合して重合体であり、その大きさ（長さ）は特に限定されず、例えば塩基数として数 b_p から数 k_b に至るものでもよい。

本明細書で用いる蛍光ヌクレオチドと言う用語は、核酸成分が上記したようなヌクレオチド、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドである場合の全てを含む意味で用いられる。

【 0 0 2 0 】

A はヌクレオチド残基中の塩基部分で B と結合する。ヌクレオチド残基の塩基部分としては、プリン誘導体とピリミジン誘導体が挙げられる。プリン塩基中における連結基 B との結合部位は、糖成分と結合する 9 位以外であれば特に制限されず、例えばプリン塩基がアデニンの場合には 2 位または 8 位で、あるいは 6 位に存在するアミノ基で連結基 B と結合することができ、プリン塩基がグアニンの場合には 1 位または 8 位で、あるいは 2 位に存在するアミノ基で連結基 B と結合することができる。ピリミジン塩基中における連結基 B との結合部位は、糖成分と結合する 1 位以外であれば特に限定されず、例えばピリミジン塩基がシトシンの場合には 5 位または 6 位、あるいは 4 位に存在するアミノ基で連結基 B と結合することができ、ピリミジン塩基がチミンの場合には 3 位または 6 位、あるいは 5 位に存在するメチル基で連結基 B と結合することができ、またピリミジン塩基がウラシルの場合には 3 位、5 位または 6 位で連結基 B と結合することができる。

【 0 0 2 1 】

上記式中、B は 2 価の連結基または単結合を示す。連結基の種類は、本発明の蛍光ヌクレオチドの性質（即ち、蛍光ヌクレオチドの化合物としての安定性、水溶性、核酸への取込み率、または蛍光強度など）に大きな影響をもたらさない限り、特に限定されない。当業者ならば、A で表されるヌクレオチド部分と C で表

される蛍光化合物成分とを連結するのに適した2価の連結基を適宜選択することができる。

連結基Bは、一般的には $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NH}-$ またはこれらの組み合わせから成る連結基であって、連結基上の水素原子は置換基でさらに置換されていてもよい。連結基の主鎖の炭素数は特に限定されないが、一般的には1～50、好ましくは1～20、より好ましくは1～10、特に好ましくは1～5である。

【0022】

上記式中、Cは、(1)分子内に0ないし1個のスルホン酸基またはリン酸基を有する蛍光色素（特に好ましくは、シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素）から誘導される1価の基、あるいは(2)分子内にスルホン酸基、リン酸基、カルボン酸基以外の水溶性基を有する蛍光色素（特に好ましくは、シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素）から誘導される1価の基を示す。

【0023】

Cで表される1価の基が誘導される蛍光色素としては、例えば、シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素が好ましく、例えば、特開平9-124599号公報等に記載されている公知の色素を用いることができる。特開平9-124599号公報には、スルホン酸基を有さないインドシアニン化合物が記載されているが、スルホン基が逆転写反応等の核酸合成反応における核酸への取り込み効率の低下に寄因していることは論じられていない。本発明では、蛍光ヌクレオチドとしての最適な分子構造を設計するにあたり、核酸分子がマイナスチャージである点に着目して、マイナスチャージを有する分子同士の反発を低減することを目的として、蛍光色素にスルホン酸基、リン酸基等のマイナスチャージを有する官能基をできるだけ少なくしたことに特徴がある。即ち、本発明の一態様では、蛍光ヌクレオチドは、蛍光色素成分中に存在するスルホン酸基またはリン酸基の数が0ないし1個であることを特徴とする。

【0024】

しかし、これらのマイナスチャージを有する官能基を少なくすることで、特に分子量の大きな蛍光色素の場合には不溶性になる場合がある。本発明の一側面に

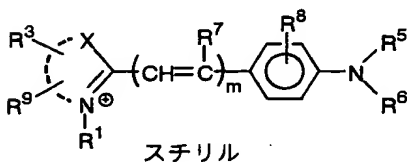
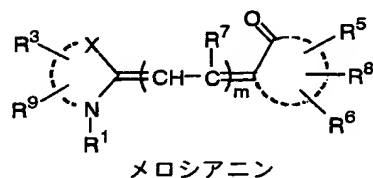
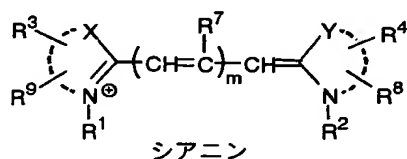
においては、このような不溶性に関する問題点を、色素の発色団に水溶性の官能基を導入することで解決している。即ち、本発明の一態様では、蛍光ヌクレオチドは、蛍光色素成分中にスルホン酸基以外の水溶性基を有することを特徴とする。蛍光色素に導入することができる水溶性の官能基としては、スルホンアミド、ポリエーテル、低級アルコール、糖鎖、3級アミン、4級アンモニウム塩等が挙げられる。

【0025】

本発明で使用する蛍光色素は、好ましくはシアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素である。シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素の好ましい具体的構造としては、例えば以下の一般式で表される構造が挙げられる。

【0026】

【化5】



【0027】

[式中、XおよびYはそれぞれ独立にO、SおよびC(CH₃)₂よりなる群から選ばれ、mは1、2、3および4よりなる群から選ばれる整数であり、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、又はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示し、該アルキル基のアルキル鎖中には酸素原子又は硫

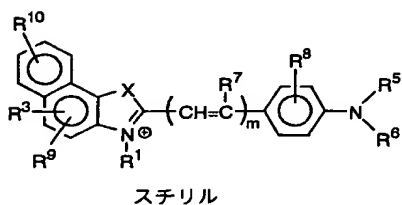
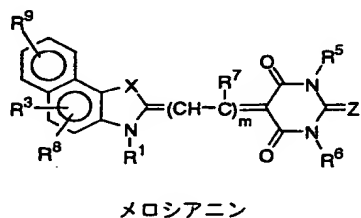
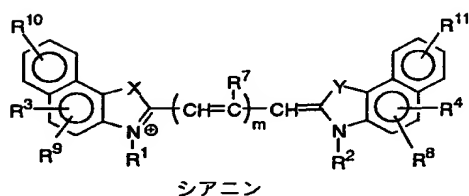
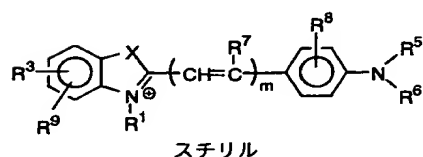
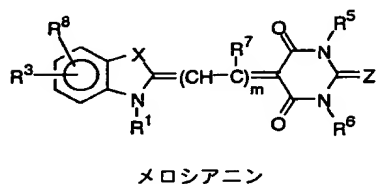
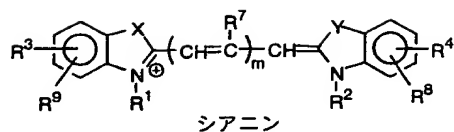
黄原子が介在していてもよく、 R^1 及び R^2 の少なくとも片方はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示す。 R^3 から R^9 はそれぞれ独立して水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。点線はそれぞれ前記シアニン、メロシアニンおよびスチリル蛍光色素を形成するのに必要な炭素原子を表す。]

【0028】

シアニン、メロシアニン又はスチリル蛍光色素のさらに好ましいが具体的構造としては、例えば、以下の一般式で表される構造が挙げられる。

【0029】

【化 6】



【0030】

[式中、XおよびYはそれぞれ独立にO、SおよびC(CH₃)₂よりなる群から選ばれ、ZはOおよびSよりなる群から選ばれ、mは1、2、3および4よりなる群から選ばれる整数であり、R¹及びR²はそれぞれ独立に水素原子、又はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示し、該アルキル基のアルキル鎖中には酸素原子又は硫黄原子が介在していてもよく、R¹及びR²

の少なくとも片方はBと共有結合し得る反応性基で置換されていてもよいアルキル基を示す。 R^3 から R^{11} はそれぞれ独立して、水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。]

【0031】

本明細書において、アルキル基とは、直鎖状、分枝鎖状、環状、又はそれらの組み合わせのいずれでもよく、特に言及しない場合を除き、炭素原子数が1～20程度である。 R^1 及び R^2 が示すアルキル基は同一でも異なってもよく、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、シクロヘキシル基などを挙げることができる。 R^1 及び R^2 が示すアルキル基は、アルキル鎖上の任意の位置に1又は2個以上の置換基を有していてもよい。2個以上の置換基を有する場合には、それらは同一でも異なってもよい。

【0032】

R^1 及び R^2 が示すアルキル基上の置換基の種類は特に制限されないが、上記一般式の蛍光色素を蛍光標識としてヌクレオチドに導入するために、ヌクレオチド（またはヌクレオチドに結合した連結基）との間で共有結合、イオン結合、水素結合などの結合を形成できる反応性基が導入されていることが好ましい（本明細書において「反応性基」とは、上記の特徴を有する置換基を意味する）。

【0033】

R^1 及び R^2 が示すアルキル基上に導入可能な反応性基としては、例えば、サクシンイミジルエステル基、ハロゲン置換トリアジニル基、ハロゲン置換ピリミジニル基、スルホニルハライド基、 α -ハロアセチル基、マレイミジル基、アジリジニル基などを挙げることができる。これらの反応性基のほか、例えば、ハロゲン原子（本明細書において「ハロゲン原子」という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、メルカプト基、シアノ基、ニトロ基、カルボキシ基、リン酸基、スルホ基、ヒドロキシ基、アミノ基、イソチオシアナート基、イソシアナート基、炭素原子数が1～8のアルコキシ基（例えば、メトキシ基、エトキシ基など）、炭素原子数が6～20のアリールオ

キシ基（例えば、フェノキシ基、ナフトキシ基など）、炭素原子数が2～10のアルコキシカルボニル基（例えば、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基）、炭素原子数が6～20のアリールオキシカルボニル基（例えば、フェノキシカルボニル基など）、炭素原子数が2～10のアシル基（例えば、アセチル基、ピバロイル基など）、炭素原子数が2～8のアシルオキシ基（例えば、アセチルオキシ基、ベンゾイルオキシ基など）、炭素原子数が2～8のアシルアミノ基（例えば、アセチルアミノ基など）、炭素原子数が1～8のスルホニル基（例えば、メタンスルホニル基、エタンスルホニル基、ベンゼンスルホニル基など）、炭素原子数が1～20のスルフィニル基（例えば、メタンスルフィニル基、エタンスルフィニル基、ベンゼンスルフィニル基など）、炭素原子数が1～8のスルホニルアミノ基（例えば、メタンスルホニルアミノ基、エタンスルホニルアミノ基、ベンゼンスルホニルアミノ基など）、炭素原子数が1～10のカルバモイル基（例えば、カルバモイル基、メチルカルバモイル基、モリホリノカルバモイル基など）、炭素原子数が1～20の置換アミノ基（例えば、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、ベンジルアミノ基、アニリノ基、ジフェニルアミノ基など）、炭素原子数が2～10のスルファモイル基（例えば、メチルスルファモイル基、エチルスルファモイル基、ピペリジノスルファモイル基など）、炭素原子数が0～15のアンモニウム基（例えば、トリメチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基など）、炭素原子数が0～15のヒドラジノ基（例えば、トリメチルヒドラジノ基など）、炭素原子数が1～15のウレイド基（例えば、ウレイド基、N,N-ジメチルウレイド基など）、炭素原子数が1～15のイミド基（例えば、スクシンイミド基など）、炭素原子数が1～20のアルキルチオ基（例えば、メチルチオ基、エチルチオ基など）、炭素原子数が6～20のアリールチオ基（例えば、フェニルチオ基、p-メチルフェニルチオ基、p-クロロフェニルチオ基、2-ピリジルチオ基、ナフチルチオ基など）、炭素原子数1～20の置換又は無置換のヘテロ環基（例えば、ピリジル基、5-メチルピリジル基、チエニル基、フリル基、モルホリノ基、テトラヒドロフリル基、2-ピラジル基など）、炭素原子数2～18の不飽和炭化水素基（例えば、ビニル基、エチニル基、1-シクロヘキセニル基、ベンジリジン基、ベンジリデン基など）、炭素原子数が6～

20の置換若しくは無置換のアリール基（例えば、フェニル基、4-スルホフェニル基、2,5-ジスルホフェニル基、4-カルボキシフェニル基、ナフチル基など）、炭素原子数が1～20のアルキル基（例えば、メチル基、エチル基、プロピル基など）が挙げられる。

【0034】

R^1 及び R^2 の好ましい例として、カルボキシル基、イソチオシアナート基、サクシンイミジルエステル基、スルホニルハライド基、 α -ハロアセチル基、又はマレイミジル基が置換した炭素原子数1～15のアルキル基、及びカルボキシル基、イソチオシアナート基、サクシンイミジルエステル基、スルホニルハライド基、 α -ハロアセチル基、又はマレイミジル基が置換した炭素原子数7～20のアリールアルキル基を挙げることができる。さらに好ましい例として、カルボキシル基、イソチオシアナート基、又はサクシンイミジルエステル基が置換した炭素原子数1～10のアルキル基を挙げることができる。

【0035】

R^3 から R^{11} はそれぞれ独立して、水素原子又は一価の置換基を示し、これらのうち隣接する2つの基は互いに結合して環を形成してもよい。

R^3 から R^{11} が示す置換基の種類は特に限定されず、それらは同一でも異なってもよい。これらの基が示す置換基としては、例えば、 R^1 及び R^2 が示すアルキル基上の置換基として例示したもの（反応性置換基を含む）を用いることができる。

【0036】

R^3 から R^{11} のうち隣接する2つの基は互いに連結して飽和又は不飽和の環を形成してもよい。形成される環としては、5～7員環を挙げることができる。不飽和環は縮合芳香族環を形成していてもよい。不飽和環は酸素原子、窒素原子、硫黄原子等のヘテロ原子を含んでいてもよい。形成される環の環上の任意の位置には R^1 及び R^2 でアルキル基上の置換基として例示した置換基、又はアルキル基が1又は2個以上置換していてもよい。

【0037】

R^3 から R^{11} の好ましい例としては、例えば、水素原子、ハロゲン原子（フッ

素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子)、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、炭素原子数が 1～6 のアルキル基 (R^1 及び R^2 が示すアルキル基上の置換基として例示した置換基 (反応性置換基を含む) が任意の位置に置換していてもよい)、炭素原子数が 6～20 のアリール基 (R^1 及び R^2 が示すアルキル基上の置換基 (反応性置換基を含む) として例示した置換基が任意の位置に置換していてもよい)、炭素原子数が 1～10 のチオアルキル基、炭素原子数が 1～10 のアルキルスルホン基、炭素原子数が 1～10 のアルコキシ基、置換アミノ基、イソチオシアナート基、イソシアナート基、サクシンイミジルエステル基、ハロゲン置換トリアジニル基、ハロゲン置換ピリミジニル基、スルホニルハライド基、 α -ハロアセチル基、マレイミジル基、アジリジニル基、モノクロロトリアジン、ジクロロトリアジン、モノ-ないしジハロゲン置換ピリジン、モノ-ないし-ハロゲン置換ジアジン、酸ハライド、ヒドロキシスクシンイミドエステル、ヒドロキシルホスクシンイミドエステル、イミドエステル、ヒドラジン、アジドニトロフェニル、アジド、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド、グリオキサールおよびアルデヒドなどが挙げられる。

本発明では、 R^3 から R^9 の少なくとも一つ、又は R^3 から R^{11} の少なくとも一つは、水素原子以外であることが好ましい。

【0038】

上述したような蛍光色素は、本発明の蛍光ヌクレオチドにおいて蛍光標識成分として使用される。

ヌクレオチドに蛍光色素を蛍光標識として導入するための手法は種々知られており、当業者に利用可能な手段を適宜選択して利用することが可能である。例えば、ヌクレオチド中のアミノ基、水酸基などの官能基と蛍光色素中のカルボキシル基、活性エステル基等の反応性置換基をイオン結合的又は共有結合的に直接結合させるか、あるいはヌクレオチドの一部に連結基を導入するなどの化学修飾を行った後に蛍光色素を反応させればよい。

反応後に生成した蛍光ヌクレオチドは、クロマトグラフィー、電気泳動、再結晶などの汎用の分離技術により精製することができる。

【0039】

本発明はさらに、本発明の蛍光ヌクレオチドの利用にも関する。即ち、本発明の蛍光ヌクレオチドは核酸の検出のために利用することができる。

本発明の蛍光ヌクレオチドを、核酸の検出などのDNA解析に用いる場合には、例えば、ルース (Jerry L. Ruth, DNA, 3, 123 (1984)) に記載の方法でプローブ又はプライマーに本発明の蛍光ヌクレオチドを取り込ませることができる。即ち、本発明は、核酸合成酵素と鋳型核酸と本発明の蛍光ヌクレオチドとを用いて核酸合成反応を行うことを含む、蛍光標識された核酸の調製方法をも提供する。

【 0 0 4 0 】

本明細書で言う核酸合成酵素の具体例としては、DNAポリメラーゼ (Klenow 酵素、Taq DNAポリメラーゼなど全てのDNAポリメラーゼを含む)、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素またはターミナルトランスフェラーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。鋳型核酸の種類はDNAでもRNAでもよく、天然由来のDNAまたはRNA、組み換えDNAまたはRNA、化学合成DNAまたはRNAの何れでもよい。核酸合成反応は、例えば、鋳型DNA、非蛍光のヌクレオチド混合物、本発明の蛍光ヌクレオチド、および核酸合成酵素を用いて、酵素反応に適した条件 (塩濃度、pH、温度など) 下において行うことができる。このような核酸合成法は当業者に周知であり、標識の目的などに応じて、使用する材料や試薬などは当業者ならば適宜選択することができる。

【 0 0 4 1 】

各種方法を用いて本発明の蛍光ヌクレオチドで核酸 (DNA又はRNA) を標識することができる。

ランダムプライム法はDNAを標識するための一つ方法であり、任意の組み合わせのヘキサヌクレオチド配列の混合物をプライマー (ランダムプライマー) として使用し、このランダムプライマーを標識すべき核酸にハイブリダイゼーションさせる。このランダムプライマーの3' -OH末端から出発し、1本鎖に相補的な鎖をKlenow酵素などのDNAポリメラーゼ又は他のDNAポリメラーゼを用いて合成するが、その際DNAポリメラーゼの基質である4種のデオキシリボヌクレオチドが相補鎖中に挿入される。これらのデオキシリボヌクレオチドの少な

くとも1種として本発明の蛍光ヌクレオチドを用いることにより、蛍光ヌクレオチドで標識された相補的DNAが合成される。

【0042】

ランダムプライマーの代わりに、特異的配列を有するオリゴDNA（特異的プライマー）を用いることができる。特異的プライマーは鋳型DNA中の相補的領域に結合し、鋳型DNAに対する相補的DNAの合成は特異的プライマーの3'-OH末端から開始される。ランダムプライム法の場合と同様に、相補的DNAが合成される際に本発明の蛍光ヌクレオチドが取込まれることにより、蛍光標識された相補的DNAが合成される。

【0043】

ニッケトランスレーション法は、DNアーゼIの2本鎖DNAへの作用を利用した方法である。DNアーゼIの作用により鋳型2本鎖DNAの1本鎖に切断される箇所が生じる。同時に大腸菌DNAポリメラーゼIと、この酵素の基質である4種のデオキシリボヌクレオチドと、本発明の蛍光ヌクレオチドとを反応混合物中に添加しておく。大腸菌DNAポリメラーゼIは、切断された1本鎖の5'-末端デオキシリボヌクレオチドを切断し、同時に基質のデオキシリボヌクレオチド1個を遊離している3'-OH末端の隣接に挿入する。この過程を繰り返すことにより切断部位が3'末端に移動していく。基質のヌクレオチド中に本発明の蛍光ヌクレオチドを含めることによって、ニッケトランスレーション法を用いて蛍光DNAが合成することができる。

【0044】

2本鎖又は1本鎖DNAの3'末端を標識する場合には、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを3'-OH末端に結合する酵素であるターミナルトランスフェラーゼを用いることができる。ターミナルトランスフェラーゼは少なくとも1種のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドを基質として必要とする。本発明の蛍光ヌクレオチドをターミナルトランスフェラーゼの基質として用いることによって、3'-OH末端で伸長された蛍光標識核酸を合成することができる。

【0045】

逆転写反応法は 1 本鎖 RNA から相補的 DNA を合成する反応である。まず、プライマーとしてオリゴデオキシリボヌクレオチドを RNA の相補的部分にアニーリングさせた後に、逆転写酵素を用いて伸長反応を行うことによって、RNA 鎖に相補的な DNA 鎖がプライマーの 3' - OH 末端から出発して合成される。この DNA 合成においても 4 種のデオキシリボヌクレオチドが酵素基質として使用され、本発明の蛍光ヌクレオチドをその中に添加しておくことによって逆転写反応中に蛍光ヌクレオチドが伸長していく DNA 鎖に挿入され、蛍光標識 DNA が合成される。

【 0 0 4 6 】

DNA から RNA を合成する酵素を用いて、本発明の蛍光ヌクレオチドで標識された RNA を合成することもできる。DNA から RNA を合成する酵素としては、SP 6、T 3 又は T 7 RNA ポリメラーゼなどのファージによりコードされる RNA ポリメラーゼである。これらの酵素は SP 6、T 3 又は T 7 プロモーターを含む 2 本鎖 DNA ならびに RNA 合成のための酵素であり、基質としての 4 種類のリボヌクレオチドが使用される。基質の一つとして本発明の蛍光ヌクレオチドを使用することによって、蛍光標識された RNA を合成することができる。

【 0 0 4 7 】

あるいはまた、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて本発明の蛍光ヌクレオチドで標識された核酸を合成することもできる。PCR では、生物試料中の検出すべき核酸は 1 本鎖に変性され、2 種のプライマーがこの一本鎖核酸にアニーリングする。アニーリング後、ポリメラーゼ (好ましくは Taq DNA ポリメラーゼ) 及び酵素基質としてのデオキシリボヌクレオチドにより伸長反応を行う。プライマーの 3' - OH 末端から出発して相補的 DNA が合成され、二本鎖 DNA が形成される。この工程を繰り返すことにより、試料中に含まれる検出すべき DNA を増幅することができる。Taq DNA ポリメラーゼによる伸長反応の際に、基質の一つとして本発明の蛍光ヌクレオチドを用いることにより、蛍光標識された増幅核酸が得られる。

【 0 0 4 8 】

上記のようにして調製された、本発明の蛍光ヌクレオチドで標識された蛍光核

酸は、ハイブリダイゼーションによる相同核酸配列の検出のための遺伝子プローブとして用いることができる。標的核酸のハイブリダイズした蛍光ヌクレオチドは、蛍光強度計で蛍光強度を測定することにより容易に検出することができる。

【0049】

上記で詳述した通り、本発明の蛍光ヌクレオチドは遺伝子プローブの標識のために用いることができるので、核酸検出用の試薬または診断薬として有用である。

本発明の蛍光ヌクレオチドを核酸検出用の試薬または診断薬として用いる場合には、1種又は2種以上の添加物を配合して試薬組成物の形態で供給することができる。例えば、緩衝剤、溶解補助剤、pH調節剤、防腐剤など適宜の添加物を用いて、溶液剤などの所望の形態の試薬を調製することができる。試薬の形態およびその製造方法は、当業者が適宜選択可能である。

【0050】

本発明の蛍光ヌクレオチドはまた、上記した核酸合成反応に使用する酵素、並びに緩衝液などと一緒に、核酸検出用キットの形態で供給することもできる。キットに含めるべき試薬の種類はキットの目的に応じて適宜選択することができる。蛍光ヌクレオチド、核酸合成酵素、緩衝液に加えて、1種類以上（好ましくは4種類）の非蛍光のヌクレオチド混合物、精製水などを挙げることもできる。また、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、あるいは目的に応じた特異的プライマーなどのプライマーをキットに含めることもできる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。本発明の精神から離れることなく、実施例に記載の材料および方法を変更、改良又は置換できることは当業者には自明である。

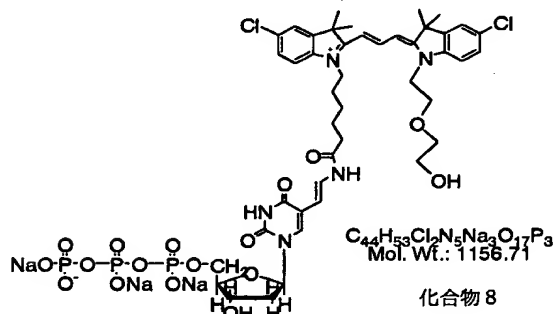
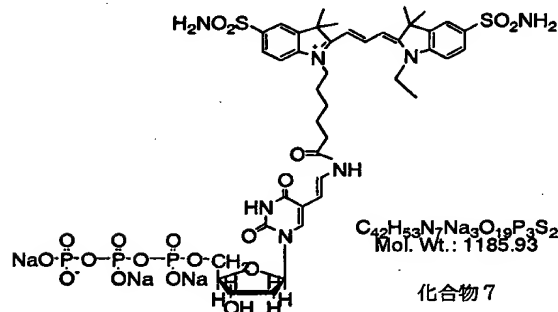
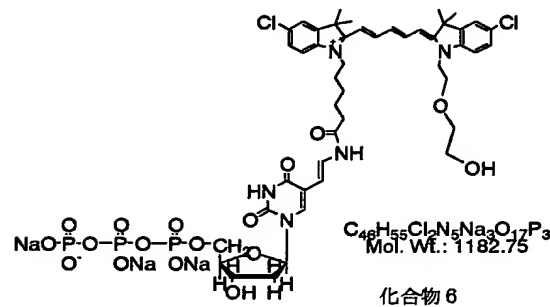
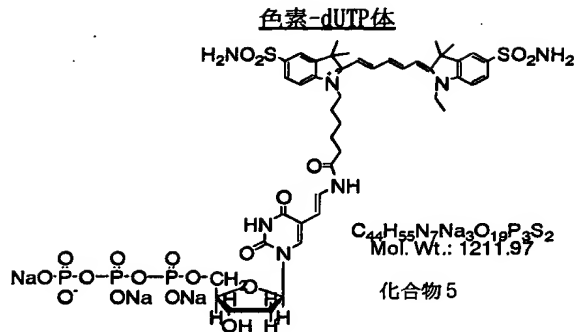
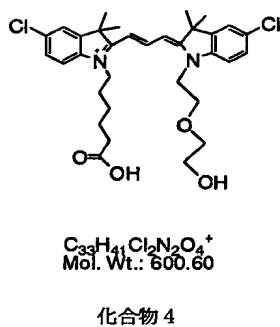
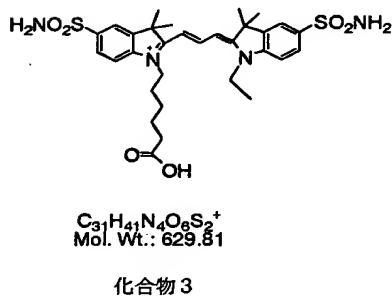
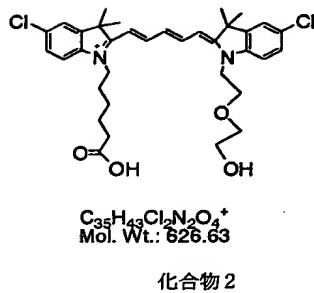
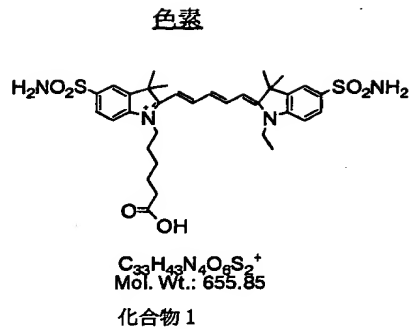
【0051】

【実施例】

実施例で合成及び使用した化合物（化合物1～8）の構造を以下に示す。

【0052】

【化 7】



【0053】

実施例 A : 化合物 1 ~ 4 の合成

本発明で使用する化合物は、市販の4置換アニリン誘導体 (4-chloroaniline, 4-amino-benzenesulfonamide) よりフィッシャーらの方法 (E. Fisher, O. Hes

s, Berichte, 17, 559(1883)) に従って合成した2,3,3-トリメチルインドレニン誘導体を原料として合成した。

【0054】

(化合物1の合成)

2,3,3-トリメチルインドレニン-5-スルホンアミド9.5g(0.04 mol)に大過剰のヨウ化エチルを加え24時間還流させた。過剰のヨウ化エチルをデカンテーションで除いた後、アセトンで繰り返し洗浄し、N-エチル2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホンアミドヨウ素塩(化合物A)を得た。収量6.8g、収率42%であった。

2,3,3-トリメチルインドレニン-5-スルホンアミド9.5g(0.04 mol)に6-ブromoヘキサン酸9.8g(0.05mol)及び1,2-ジクロロベンゼン(100ml)を加え110℃で12時間加熱した。冷却後反応液を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、1-(5-カルボキシペンチニル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-スルホンアミド臭素塩(化合物B)を得た。収量9.0g、収率52%であった。

化合物A 2.0g(0.005mol)及び化合物B 2.2g(0.005mol)をピリジン10mlに溶解し、110℃に加熱した後、1,3,3-トリメトキシプロペン1.0g(0.0075mol)を加え1時間加熱反応させた。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムに溶解後水洗し、溶液を乾燥、濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、目的の化合物1を得た。黒緑色粉末で、収量660mg、収率20%であった。

【0055】

(化合物2の合成)

2,3,3-トリメチルインドレニン-5-クロリド7.7g(0.04 mol)に6-ブromoヘキサン酸9.8g(0.05mol)及び1,2-ジクロロベンゼン(100ml)を加え110℃で12時間加熱した。冷却後反応液を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、1-(5-カルボキシペンチニル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-クロリド臭素塩(化合物C)を得た。収量9.3g、収率60%であった。

2,3,3-トリメチルインドレニン-5-クロリド7.7g(0.04 mol)にヨードエトキシエタノール(クロロエトキシエタノールをNAI存在下アセトン中で還流してハロゲン交換より合成) 10.8g(0.05mol)及び1,2-ジクロロベンゼン(100ml)を加え110℃で12時間加熱した。冷却後反応液を減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、1-(2-ヒドロキシエトキシエチル)-2,3,3-トリメチルインドレニウム-5-クロリドヨウ素塩(化合物D)を得た。収量7.7g、収率47%であった。

化合物C 1.6g(0.005mol)及び化合物D 1.4 g(0.005mol)をピリジン10mlに溶解し、110℃に加熱した後、1,3,3-トリメトキシプロペン1.0g(0.0075mol)を加え1時間加熱反応させた。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムに溶解後水洗し、溶液を乾燥、濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、目的の化合物2を得た。黒緑色粉末で、収量490mg、収率16%であった。

【0056】

(化合物3の合成)

化合物A 2.0g(0.005mol)及び化合物B 2.2g(0.005mol)をピリジン10mlに溶解し、110℃に加熱した後、オルトギ酸トリエチル1.1g(0.0075mol)を加え1時間加熱反応させた。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムに溶解後水洗し、溶液を乾燥、濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、目的の化合物3を得た。黒褐色粉末で、収量710mg、収率23%であった。

【0057】

(化合物4の合成)

化合物C 1.6g(0.005mol)及び化合物D 1.4 g(0.005mol)をピリジン10mlに溶解し、110℃に加熱した後、オルトギ酸トリエチル1.1g(0.0075mol)を加え1時間加熱反応させた。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムに溶解後水洗し、溶液を乾燥、濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフ(メタノール/クロロホルム)で精製し、目的の化合物4を得た。黒褐色粉末で、収量540mg、収率18%であった。

【0058】

実施例B：化合物5～8の合成

化合物 1～4 のインドレニンシアニンを用い、各化合物の d UTP 体（化合物 5～8）を合成した。

（化合物 5 の合成）

5.75mg(1.0部)の化合物 1 に1mlアセトニトリル及び0.1MのMES緩衝液2mlを加え溶解し、WSC塩酸塩2.20mg(1.2部)及びSulfo-NHS 2.52mg(1.2部)を加え室温で30分間攪拌した。これに、アミノアリル-dUTP(Sigma)2.2mgを200 μ lの0.1MのMESに溶解して添加し、室温で1晩反応させた。1M のTris緩衝液(pH7.5)100 μ lを加え反応を停止させた後、8gのODSシリカ(YMC-ODS-AQ 120A)を充填したカラムに吸着させ、30%メタノール水溶液で溶離した。溶離液を濃縮後さらに中圧分取クロマトグラフィー(YAMAZEN Ultrapack ODS-S-40B)により精製し純度95%の目的物を得た(収率63%)。

MS分析値：M- 1211

【0059】

（化合物 6 の合成）

5.40mg(1.0部)の化合物 2 を400 μ lのDMSOに溶解し、WSC塩酸塩1.86mg(1.2部)及びSulfo-NHS 2.13mg(1.2部)を加え室温で30分間攪拌した。これに、2mlの0.1MのMESに溶解したアミノアリル-dUTP(Sigma)2.2mgを添加し、室温で1晩反応させた。1MのTris緩衝液(pH7.5)100 μ lを加え反応を停止させた後、8gのODSシリカ(YMC-ODS-AQ 120A)を充填したカラムに吸着させ、40%メタノール水溶液で溶離した。溶離液を濃縮後さらに中圧分取クロマトグラフィー(YAMAZEN Ultrapack ODS-S-40B)により精製し純度92%の目的物を得た(収率56%)

MS分析値：M- 1182

【0060】

（化合物 7 の合成）

5.40mg(1.0部)の化合物 3 を400 μ lのDMSOに溶解し、WSC塩酸塩1.86mg(1.2部)及びSulfo-NHS 2.13mg(1.2部)を加え室温で30分間攪拌した。これに、2mlの0.1MのMESに溶解したアミノアリル-dUTP(Sigma)2.2mgを添加し、室温で1晩反応させた。1MのTris緩衝液(pH7.5)100 μ lを加え反応を停止させた後、8gのODSシリカ(YMC-ODS-AQ 120A)を充填したカラムに吸着させ、40%メタノール水溶液で溶離し

た。溶離液を濃縮後さらに中圧分取クロマトグラフィー(YAMAZEN Ultrapack ODS-S-40B)により精製し純度92%の目的物を得た(収率49%)

MS分析値 : M- 1185

【0061】

(化合物8の合成)

2.16mg(1.0部)の化合物4を200 μ lのDMSOに溶解し、WSC塩酸塩0.76mg(1.1部)及びSulfo-NHS 0.86mg(1.1部)を加え室温で30分間攪拌した。これに、1mlの0.1MのMESに溶解したアミノアシル-dUTP(Sigma) 2.2mgを添加し、室温で1晩反応させた。1M Tris緩衝液(pH7.5)100 μ lを加え反応を停止させた後、8gのODSシリカ(YMC-ODS-AQ 120A)を充填したカラムに吸着させ、40%メタノール水溶液で溶離した。溶離液を濃縮後さらに中圧分取クロマトグラフィー(YAMAZEN Ultrapack ODS-S-40B)により精製し純度95%の目的物を得た(収率67%)

MS分析値 : M- 1156

【0062】

実施例C : 蛍光色素標識DNAプローブの作製

実施例C-1 : インドレニンシアニン-dUTP結合体を用いた蛍光色素ラベル化DNAプローブの作製

pBlueScriptIISK(+)- α -2-HS-glycoproteinを鋳型としてT7 RNA Polymeraseを反応させcRNAを調製した(MEGAscript, Ambion)。cRNAとプライマー1(配列番号1 : TGGCCGCCTTCAACGCTCAG)混合物に、RNaseOUT (Gibco BRL) (40 U)、dATP (500 μ M)、dGTP (500 μ M)、dCTP (500 μ M)、dTTP (200 μ M)、実施例Bで得た化合物5もしくは化合物6 (100 μ M)、SuperScriptII逆転写酵素(Gibco BRL) (400 U)、DEPC処理水(全量20 μ lになる量)を添加し、42℃で2時間反応させた。

反応終了後、EDTA及びNaOHを添加し65℃で1時間インキュベートすることで、反応の停止とcRNAの分解を行った。反応液をCentriSepカラム(PRINCETON SEPARATION, INC)に通し、未反応の化合物5又は化合物6などを除去して精製した。

【0063】

また、比較用として、化合物5又は化合物6の代わりにCy5で標識した蛍光ヌクレオチド (Cy5-dUTP結合体 ; Amersham pharmacia biotech) を使用して上記と同様に逆転写反応を行い、反応物を精製した。

精製後の反応液をそれぞれアガロースゲル電気泳動し、SYBR Green II (Molecular Probes) で染色後FLA2000 (富士写真フイルム) で励起波長 : 633nm、検出波長 : 675nmにてスキャンした。これらの結果を表1に示す。さらに、FLA2000での画像を図1に示す。

【0064】

【表1】

表1	
	蛍光強度
化合物5	4500
化合物6	5000
Cy5-dUTP	600

【0065】

表1及び図1の結果から分かるように、スルホン酸基を有さない化合物5、化合物6の方が、スルホン酸基を2個持つCy5-dUTP結合体よりも優位に蛍光強度が高いことが分かった。即ち、スルホン酸基の数が少ない方が蛍光強度が高く、分子量や親水基の寄与よりも電荷を減らす効果の方が大きいことがわかった。

【0066】

実施例C-2 : インドレニンシアニン-dUTP結合体を用いた蛍光色素ラベル化DNAプローブの作製

pBlueScriptIISK(+)- α -2-HS-glycoproteinを鋳型としてT7 RNA Polymeraseを反応させcRNAを調製した (MEGAscript, Ambion)。cRNAとプライマー1 (配列番号1 : TGGCCGCCTTCAACGCTCAG) 混合物に、RNaseOUT (Gibco BRL) (40 U)、dATP (500 μ M)、dGTP (500 μ M)、dCTP (500 μ M)、dTTP (200 μ M)、化合物7もしくは化合物8 (100 μ M)、SuperScriptII逆転写酵素 (Gibco BRL) (400 U)、DEPC処理水 (全量20 μ lになる量) を添加し、42℃で2時間反応させた。

反応終了後、EDTA及びNaOHを添加し65℃で1時間インキュベートすることで、反応の停止とcRNAの分解を行った。反応液をCentriSepカラム(PRINCETON SEPARATION, INC)に通し、未反応の化合物7又は化合物8などを除去して精製した。

【0067】

また、比較用として、化合物7又は化合物8の代わりにCy3で標識した蛍光ヌクレオチド(Cy3-dUTP結合体; Amersham pharmacia biotech)を使用して上記と同様に逆転写反応を行い、反応物を精製した。

精製後の反応液をそれぞれアガロースゲル電気泳動し、SYBR Green II (Molecular Probes) で染色後FLA2000(富士写真フイルム)で励起波長:532nm、検出波長:580nmにてスキャンした。これらの結果を表2に示す。さらに、FLA2000での画像を図2に示す。

【0068】

【表2】

表2	
	蛍光強度
Cy3-dUTP	2000
化合物7	6500
化合物8	7000

【0069】

表2及び図2の結果から分かるように、スルホン酸基を有さない化合物7、化合物8の方が、スルホン酸基を2個持つCy3-dUTP結合体よりも優位に蛍光強度が高いことが分かった。即ち、スルホン酸基の数が少ない方が蛍光強度が高く、分子量や親水基の寄与よりも電荷を減らす効果の方が大きいことがわかった。

【0070】

【発明の効果】

本発明により、核酸の標識のために有効な蛍光ヌクレオチド、特に核酸合成反応の際における取り込み効率の高い蛍光ヌクレオチドを提供することが可能になった。

【0071】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Fuji Photo Film Co.Ltd.,

<120> Fluorescent Nucleotide

<130> A01180MA

<160> 1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial DNA

<400> 1

tggccgcctt caacgctcag 20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、インドレニンシアニン-dUTP結合体（化合物 5 及び化合物 6）を用いた蛍光色素ラベル化 DNA プローブをアガロースゲル電気泳動し、SYBR Green II (Molecular Probes) で染色後 FLA2000 (富士写真フイルム) で励起波長：532nm、検出波長：580nm にてスキャンした結果を示す。

【図 2】

図 2 は、インドレニンシアニン-dUTP結合体（化合物 7 及び化合物 8）を用いた蛍光色素ラベル化 DNA プローブをアガロースゲル電気泳動し、SYBR Green II (Molecular Probes) で染色後 FLA2000 (富士写真フイルム) で励起波長：532nm、検出波長：580nm にてスキャンした結果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

図1



L1:化合物5
L2:化合物6
L3:Cy5-dUTP

【図 2】

図2



L1:Cy3-dUTP
L2:化合物7
L3:化合物8

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸の効率的な標識のために有用な蛍光ヌクレオチドを提供すること

。

【解決手段】 式：A-B-C

で表される蛍光ヌクレオチド。

〔式中、Aは天然又は合成のヌクレオチド、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドあるいはそれらの誘導体の残基を示し、上記残基中の塩基部分でBと結合し、Bは2価の連結基または単結合を示し、Cは、分子内に0ないし1個のスルホン酸基またはリン酸基を有する蛍光色素から誘導される1価の基を示す。〕

【選択図】 なし

特2,000-107675

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日 1990年 8月14日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名 富士写真フイルム株式会社

NEW YORK NY 10125
325 PARK AVENUE
REED SMITH LLP